

## DE19813773

Publication Title:

Verfahren zur Herstellung von liposomalen Wirkstoffformulierungen

Abstract:

Abstract of DE19813773

The invention relates to a method for producing liposomes containing an active agent in the form of at least one physiologically effective and/or diagnostic compound by producing a mixture of membrane-forming amphiphiles, dispersing the mixture in water and homogenising the dispersion under high pressure until the liposomes are formed. The liposomal formulations are obtained by a) adjusting the mixture to produce a liposome formulation containing at least 20 wt. % lipids; b) adding the active agent to this liposome formulation and c) incubating and moving the mixture containing the active agent mechanically until at least 10 % of the liposomes contain some of the active agent, the temperature being regulated in such a way that essentially no phospholipid hydrolysis takes place but fusion is increased. The invention also relates to the liposomal formulation produced according to this method and to the use of said formulation as a diagnostic or therapeutic agent which can optionally also contain other auxiliary and support substances and/or stabilisers. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

-----

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>



18 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 198 13 773 A 1**

51 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**A 61 K 9/127**  
A 61 K 31/505  
A 61 K 31/645

21 Aktenzeichen: 198 13 773.7  
22 Anmeldetag: 27. 3. 98  
43 Offenlegungstag: 30. 9. 99

DE 198 13 773 A 1

71 Anmelder:  
Unger, Clemens, 79104 Freiburg, DE; Massing,  
Ulrich, 79106 Freiburg, DE  
74 Vertreter:  
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

72 Erfinder:  
Unger, Clemens, 79104 Freiburg, DE; Massing,  
Ulrich, 79106 Freiburg, DE; Moog, Regina, 78183  
Hüfingen, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
zu ziehende Druckschriften:  
WO 92 10 166 A1

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

54 Verfahren zur Herstellung von liposomalen Wirkstoffformulierungen

57 Zur Herstellung von Liposomen, die als Wirkstoff mindestens eine physiologisch wirksame oder/und diagnostische Verbindung enthalten, stellt man ein Gemisch von membranbildenden Amphiphilen her, dispergiert das Gemisch in Wasser und bildet durch Hochdruckhomogenisation der Dispersion Liposomen, gibt zu dieser Liposomenzubereitung insbesondere ein aus Liposomen aufgebautes Gel als Wirkstoff und inkubiert das den Wirkstoff enthaltende Gemisch solange bis hydrophile Wirkstoffe entsprechend der Volumenanteile an wäßrigem Medium innerhalb und außerhalb der Liposomen in der Zubereitung in den Liposomen bzw. zwischen den Liposomen verteilt sind (Gleichgewichtszustand) oder lipophile Verbindung im Lipidbilayer inkorporiert sind.

DE 198 13 773 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Liposomen, die als Wirkstoff mindestens eine physiologisch wirksame oder/und diagnostische Verbindung enthalten sowie die nach diesem Verfahren hergestellte Liposomenzubereitung und die Verwendung dieser Liposomenzubereitung als diagnostisches oder therapeutisches Mittel.

Liposomen sind sphärische Gebilde, die aus Amphiphilen aufgebaut sind. In wässrigen Lösungen entstehen die Liposomen durch Selbstaggregation der Amphiphilen, wobei sich eine Lipiddoppelschicht bildet, die einen wässrigen Innenraum einschließt.

In Abhängigkeit von physikalischen Parametern wie Druck, Temperatur und Ionenkonzentration sowie der vorhandenen Lipide und Zusatzstoffe, bilden sich unilamellare, oligolamellare oder multilamellare Liposomen. Die Liposomen können abhängig von ihren Bestandteilen eine positive oder negative Überschussladung tragen.

Liposomen können auch mit Wirkstoffen beladen sein, die je nach Lipophilie oder Hydrophilie in der Lipidschicht oder im wässrigen Innenraum der Liposomen eingeschlossen sind. Derartige Liposomen werden in diagnostischen Nachweisverfahren oder als therapeutisches Mittel zum Transport von Wirkstoffen im Organismus oder als Wirkstoffdepot verwendet.

Die Eigenschaften der Liposomen wie beispielsweise ihre Stabilität oder Lagerfähigkeit werden wesentlich durch die in der Lipidschicht vorhandenen Substanzen bestimmt.

Zur Synthese von Liposomen werden membranbildende Lipide, wie beispielsweise Phosphatidylcholin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin, Sphingomyelin, membranbildende Amphiphile, wie beispielsweise Blockpolymere, Alkylester, -ether, -amide von Alkoholen, Diolen und Polyolen, Aminen, Aminosäuren, Peptiden und Zuckern und Cholesterin sowie weitere Stoffe verwendet (vgl. F. Szoka Jr. und D. Papahadjopoulos, *Comperative Properties and Methods of Preparation of Lipidvesicles (Liposomes)*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1980, 9: 467-508; *Liposomes: From Physical Structure To Therapeutic Application* (1981), Knight, C. G. (ED.), Elsevier, North Holland Biomedical Press, Kapitel 2: H. Eibel, *Phospholipidssynthesis*, 19-50; Kapitel 3: F. Szoka und D. Papahadjopoulos, *Liposomes: Preparation and Characterization*, 51-104).

Zur Herstellung von Wirkstoffe enthaltende Liposomen sind mechanische Verfahren bekannt, bei denen eine die Membranbestandteile und Wirkstoffe enthaltende Dispersion durch Einwirkung starker mechanischer Kräfte, z. B. Hochdruckhomogenisation z. B. mittels einer French-Press behandelt werden. Ein anderes Verfahren basiert auf dem Austausch des organischen Lösungsmittels durch wässriges Medium oder auf der einfachen Entfernung des in der Dispersion enthaltenen Detergenz. Ein weiteres Verfahren zur Liposomenherstellung beruht auf der Veränderung des pH-Wertes (vgl. F. Szoka Jr. und D. Papahadjopoulos).

Aufgrund der Eigenschaften der einzuschließenden Wirkstoffe ist es in vielen Fällen für die Herstellung von Wirkstoffe enthaltenden Liposomen notwendig, dass die Liposomenbildung und der Einschluss der Wirkstoffe in nur einem Verfahrensschritt vollzogen wird. Die Liposomenformation und Wirkstoffeinschluss in einem Schritt ist aber oft nicht durchführbar bzw. kann verschiedene Nachteile mit sich bringen: So kann es z. B. unter den Bedingungen der Hochdruckhomogenisation (French Press, Gaulin . . .) durch die Wechselwirkungen zwischen dem Wirkstoff und den eingesetzten Lipiden und dem Medium zur Zerstörung des Wirkstoffs, zur Hydrolyse der Lipide oder zu beidem kommen.

Aus gleichen Gründen ist oft eine Sterilisierung der wirkstoffhaltigen Formulierung nicht möglich, es werden Lipidhydrolyse und/oder Zerstörung des Wirkstoffs beobachtet. Eine alternative Sterilfiltration zur Sterilisierung ist bei der Herstellung von Liposomen-Gelen nicht möglich, da diese zu hoch viskos sind. Auch bei Liposomendispersionen ist eine Sterilfiltration oft aufgrund der Größe der Vesikel nicht möglich.

Des Weiteren ist die Erarbeitung eines bestimmten Liposomen-Gels oder einer Liposomendispersion ohne gleichzeitiges Zusetzen des Wirkstoffs nicht möglich, da Wirkstoffe oft entscheidend die Formation der Lipidbilayer beeinflussen und so auch Einfluss auf die Größe der entstehenden Vesikel haben können.

Bedingt durch die apparativen Voraussetzungen bei der Liposomenherstellung ist oft die Herstellung einer Mindestmenge einer liposomalen Formulierung notwendig, die die für die Untersuchung der Präparation tatsächlich notwendige Menge weit überschreitet. Dies ist insbesondere dann von Nachteil, wenn der für den Einschluss verwendete Wirkstoff nur in begrenzter Menge zur Verfügung steht oder sehr teuer ist.

Somit können nur die Wirkstoffe enthaltenden Liposomen auf ihre Charakteristika untersucht werden. Zeigt die so hergestellte Liposomenpräparation nicht die gewünschten Eigenschaften, so muss diese Präparation einschließlich der darin enthaltenen kostbaren Wirkstoffe als Ganzes verworfen werden. Dies ist insbesondere dann von Nachteil, wenn der für die Einkapselung verwendete Wirkstoff nur in begrenzter Menge zur Verfügung steht oder sehr teuer ist.

Für bestimmte Anwendungen von Liposomenzubereitungen, insbesondere bei einer therapeutischen Anwendung, ist es außerdem erforderlich, die Liposomenpräparation zu sterilisieren. Im allgemeinen bedient man sich dazu der Sterilisation durch Autoklavieren, bei der erhöhte Temperatur- und Druckbedingungen auftreten. Bestimmte in Liposomen eingeschlossene Substanzen bewirken jedoch bei erhöhter Temperatur eine Phospholipidhydrolyse, sodass es bei einer derartigen Behandlung zur Zersetzung der Liposomenpräparation kommt. Außerdem können die Wirkstoffe bei erhöhter Temperatur instabil sein und sich beim Autoklavieren zersetzen. Somit kann die Sterilisation durch Autoklavieren für eine derartige Liposomenpräparation nicht angewendet werden.

Ein weiterer Nachteil bei der Herstellung einer wirkstoffhaltigen Liposomenformulierung durch Hochdruckhomogenisation ist die mögliche Aerosolbildung, die bei der Verwendung bestimmter Wirkstoffe eine erhebliche Gefährdung für das Bedienungspersonal darstellt. Die erforderlichen Sicherheitsvorkehrungen sind aufwändig und erschweren den Herstellungsprozess. Dies führt zu einem größeren Zeitaufwand, vermehrtem Einsatz von Arbeitsmitteln und einem höheren Personalaufwand, wodurch die Herstellungskosten erheblich erhöht werden.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe war es somit, ein Verfahren zur Herstellung von Wirkstoffen enthaltenden Liposomen bereitzustellen, mit dem sterile Liposomenpräparationen kostengünstig und ohne Gefährdung des Bedienungspersonals bereitgestellt und die Nachteile des Standes der Technik zumindest teilweise verbessert werden können.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung von Liposomen, die als Wirkstoff mindestens eine physiologisch wirksame oder/und diagnostische Verbindung enthalten, durch Herstellen eines Gemisches von membranbildenden Amphiphilen, Dispergieren des Gemisches in Wasser und Hochdruckhomogenisation der Dispersion bis zur Bildung der Liposomen, das dadurch gekennzeichnet ist,

dass

(a) zu einer beliebigen Liposomenzubereitung, vorzugsweise ein Liposomen-Gel, das mindestens 20 Gew.-% Lipid enthält, der Wirkstoff gegeben wird und

(b) das den Wirkstoff enthaltende Gemisch, gegebenenfalls unter mechanischer Bewegung, solange inkubiert wird, bis

(i) hydrophile Wirkstoffe entsprechend der Volumenanteile an wässrigem Medium innerhalb und außerhalb der Liposomen in der Zubereitung in den Liposomen bzw. zwischen den Liposomen verteilt sind (Gleichgewichtszustand) oder

(ii) lipophile Verbindungen im Lipidbilayer inkorporiert sind.

Hierbei wird die Temperatur so geregelt, dass keine wesentliche Lipidhydrolyse auftritt, die Diffusion der Wirkstoffe über den Lipidbilayer bzw. die Aufnahme in den Bilayer aber gesteigert wird.

Als Wirkstoffe können alle Verbindungen eingesetzt werden, die unter den gegebenen Bedingungen über Lipidbilayer diffundieren (hydrophile Verbindungen) oder in Lipidbilayer inkorporiert werden können (lipophile Verbindungen).

Es war überraschend, dass mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine fertige Liposomenzubereitung nachträglich mit guten Ausbeuten mit Wirkstoffen beladen werden kann. Unerwartet war, dass der Wirkstoff als Feststoff oder in konzentrierter wässriger Lösung zu der fertigen Liposomenzubereitung zugegeben werden kann und durch Temperaturerhöhung und gegebenenfalls durch einfaches mechanisches Durchmischen, Rühren oder Schütteln unter Verwendung einer für diesen Zweck geeigneten Vorrichtung, wie z. B. eines Horizontalschüttlers, zu guten Einschussraten des Wirkstoffs in die Liposomenzubereitung führt. Ein weiterer Vorteil ist die einfache Durchführbarkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens sowie der geringe apparative und personelle Aufwand. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird auch die Einkapselung von toxischen Stoffen ohne besondere Sicherheitsmaßnahmen und dem Einsatz von aufwendigen Sicherheitsvorkehrungen apparativer Art möglich. Die Gefährdung des Bedienungspersonals durch Aerosolbildung ist im erfindungsgemäßen Verfahren im Gegensatz zu bekannten Verfahren weitgehend ausgeschlossen. Das erfindungsgemäße Verfahren führt somit zu einer erheblichen Kostenreduzierung und Vereinfachung des Herstellungsprozesses für Wirkstoffe enthaltende Liposomenzubereitungen.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren können alle bekannten Liposomenzubereitungen, wie beispielsweise unilamellare, bilamellare, multilamellare Liposomenzubereitung oder/und Liposomen mit positiver oder negativer Überschussladung verwendet werden.

Als Bestandteile der Lipidschicht der Liposomen können alle für diesen Zweck geeigneten membranbildenden Amphiphile sowie weitere Stoffe verwendet werden, wie beispielsweise Phosphatidylcholin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin, Sphingomyelin, Cholesterin, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, membranbildende Amphiphile, wie beispielsweise Blockpolymere, Alkylester, -ether, -amide von Alkoholen, Diolen, Polyolen, Aminen, Aminosäuren, Peptiden und Zuckern sowie weitere Stoffe, die sich in einer wässrigen Umgebung in der Lipidschicht anordnen. Gegebenenfalls können organische oder anorganische Salze sowie Säuren oder Basen zur Einstellung des pH-Wertes und des osmotischen Drucks in der Liposomenzubereitung ge-

löst sein. Insbesondere bei Verwendung der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Liposomenzubereitung für medizinische Zwecke, wie beispielsweise Injektion oder Einbringen der erfindungsgemäßen Liposomenzubereitung in Körperhöhlen werden sterile Lösungen und Substanzen sowie Wasser nach Deutschem Arzneibuch ("Wasser für Injektionszwecke") verwendet. Die Liposomenzubereitung kann vor der Inkubation mit dem Wirkstoff durch geeignete Methoden sterilisiert werden, wie beispielsweise autoklavieren.

Die Liposomen der Liposomenzubereitung können kleine, mittlere oder große Durchmesser aufweisen, vorzugsweise wird eine Liposomenzubereitung mit Liposomen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 10 bis 400 nm verwendet.

Die Liposomenzubereitung kann eine Liposomen enthaltende Dispersion sein, vorzugsweise wird ein aus Liposomen aufgebautes Gel verwendet.

Für das erfindungsgemäße Verfahren können polare wie unpolare Substanzen, diagnostisch und therapeutisch wirksame Substanzen verwendet werden, die aufgrund ihrer Diffusionseigenschaften in der Lage sind, (langsam) in oder über den Lipidbilayer zu diffundieren. Beispiele sind z. B. Zytostatika, Antibiotika, Kontrastmittel. Es kann ein einziger Wirkstoff eingeschlossen werden oder auch eine Mehrzahl davon. Der Einschluss kann im Innenraum der Liposomen oder/und in der Membran oder/und zwischen Membranschichten erfolgen. Alle diese Einschlussarten werden zusammenfassend als Inkorporation bezeichnet.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird als therapeutischer Wirkstoff Gemcitabine, Vindesine, Amphotericin B oder/und Anthracycline, insbesondere Doxorubicin, verwendet. Als in der Forschung eingesetzter Fluoreszenzfarbstoff wird vorzugsweise Calcein verwendet.

Die Verfahrensbedingungen werden an die jeweils verwendete Liposomenzubereitung und den verwendeten Wirkstoff angepasst, um die gewünschte Aufnahme des Wirkstoffs in die Liposomenzubereitung zu erhalten. Die Aufnahmegewindigkeit und Einschlusseffizienz des Wirkstoffs in die Liposomenzubereitung werden durch die Diffusionseigenschaften des Wirkstoffs und die Liposomencharakteristika beeinflusst.

Die Diffusionseigenschaften des Wirkstoffs sind wiederum abhängig von Parametern, wie beispielsweise Molekulargewicht, Öl-Wasser-Koeffizient oder Protonierungsgrad.

Die Liposomencharakteristika werden bestimmt durch Parameter, wie beispielsweise Art und Gehalt der membranbildenden Amphiphilen, Gehalt an Cholesterin, und dem Gehalt und der Art von zusätzlichen Stoffen in der Lipidschicht. Insbesondere das maximale Verhältnis von wässriger Phase in den Liposomen zu wässriger Phase außerhalb der Liposomen sowie Vorliegen der Liposomen in einer Liposomendispersion oder in einem Liposomengel bestimmen die Einschlusseffizienz.

Alle für das Verfahren relevanten Parameter werden optimal aufeinander abgestimmt. Insbesondere die Temperatur wird so eingestellt, dass die Diffusion des Wirkstoffs in die Liposomen gesteigert wird, ohne dass es zu einer wesentlichen Phospholipidhydrolyse kommt. Vorzugsweise wird das den Wirkstoff enthaltende Gemisch bei einer Temperatur von 30 bis 80°C, mehr bevorzugt von 50-70°C und am meisten bevorzugt um etwa 60°C inkubiert.

Inkubationstemperatur und Inkubationszeit hängen voneinander ab, d. h. bei Erhöhung der Inkubationstemperatur kann die Inkubationszeit vermindert werden, will man den gleichen Einschlussgrad wie bei verminderter Inkubationstemperatur erhalten.

Die einzelnen Komponenten werden solange inkubiert,

bis die maximale Aufnahme erreicht ist (Gleichgewichtszustand bei hydrophilen Verbindungen, nahezu vollständige Aufnahme bei lipophilen Verbindungen). Bei einer nicht vollständigen Aufnahme des Wirkstoffs in die Liposomen des Gels befindet sich somit ein Teil des Wirkstoffs in den Liposomen und der übrige zu der Liposomenzubereitung zugegebene Wirkstoff außerhalb der Liposomen in der Suspension oder dem Gel. Ein so hergestelltes Liposomen-Gel kann den Wirkstoff in verzögerter Weise über einen längeren Zeitraum abgeben, wobei eine gute Retardwirkung dadurch erreicht wird, dass ein Wirkstoff, um das Liposomen-gel zu verlassen, vielfach aus einzelnen Liposomen herausdiffundieren und wiederum in Liposomen hineindiffundieren muss, da die Liposomen sehr dicht gepackt sind. Andererseits kann bei auf die erfindungsgemäße Weise hergestellten Liposomendispersionen der nicht in die Liposomen eingeschlossene Wirkstoff rasch zur Wirkung gelangen (Initialdosis), während der eingeschlossene Anteil verzögert freigesetzt und wirksam wird. Alternativ wird der nicht inkorporierte Teil des Wirkstoffs aus der Liposomenzubereitung abgetrennt, wenn freier Wirkstoff nicht erwünscht ist. Vorzugsweise wird ein erfindungsgemäß hergestelltes Wirkstoffe enthaltendes Liposomen-gel für medizinische Applikationen verwendet.

Wie oben beschrieben, hängt die Aufnahmegeschwindigkeit und Einschlusseffizienz unter anderem von den Eigenschaften des Wirkstoffs ab. Lipophile Wirkstoffe werden von den Liposomen im wesentlichen in der Lipidschicht eingeschlossen, wogegen hydrophile Wirkstoffe im wesentlichen in dem wässrigen Innenraum der Liposomen eingeschlossen werden. Lipophile Wirkstoffe zeigen sehr hohe Einschlußraten. Sie können mit einer Einschlußrate von bis zu 100% in Liposomen inkorporiert werden. Vorzugsweise wird das Gemisch inkubiert, bis der lipophile Wirkstoff vollständig in die Liposomenmembran aufgenommen ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Liposomenzubereitung, erhalten bzw. erhältlich nach einem wie oben beschriebenen Verfahren.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer Liposomenzubereitung, erhalten bzw. erhältlich nach einem wie oben beschriebenen Verfahren als diagnostisches oder therapeutisches Mittel, das gegebenenfalls weitere Hilfs-, Trägerstoffe oder/und Stabilisatoren enthält.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Liposomenzubereitung, erhalten bzw. erhältlich durch Redispersieren der Liposomen durch schrittweise Zugabe von wässrigem Medium zu dem die Liposomen enthaltenden Gel. Die so erhaltene Formulierung kann systemisch, beispielsweise durch i. v. Injektion appliziert werden.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern.

#### Beispiele

##### Beispiel 1

Ein Liposomen-gel, das als Wirkkomponente das Zytostatikum Gemcitabine enthält, kann nicht autoklaviert werden, da dieses Antitumormittel die Hydrolyse der Phospholipide beschleunigt, was unter Standardbedingungen während des Autoklavierens zu einem vollständigem Phospholipidabbau führt. Die Anforderung der Keimfreiheit für Arzneimittel zur parenteralen Anwendung kann nur durch nachträgliches Einbringen des Wirkstoffes in das Liposomen-gel erreicht werden. Hierzu werden das Liposomen-gel und eine hochkonzentrierte, gepufferte Gemcitabine-Lösung getrennt autoklaviert und anschließend unter aseptischen Bedingungen

zusammengebracht. Nach vierstündiger Inkubation bei 60°C wird eine Schlusseffizienz von über 30% erreicht (Gleichgewicht).

Diese Zubereitung eignet sich zur direkten Installation in die Bauchhöhle bei Ovarial-CA, zur Blasen-spülung bei Blasen-CA sowie zur intratumoralen Applikation.

##### Beispiel 2

Das Zytostatikum Vindesine ist hochwirksam und wird in der Klinik in niedrigen Gesamtdosen eingesetzt. Wird der Wirkstoff mittels der herkömmlichen Technik der Liposomen-gelherstellung bereits während der Hochdruckhomogenisation eingeschlossen, sind strenge Sicherheitsmaßnahmen zu treffen, um eine Inhalation entstehender Aerosole und mögliche Spätschäden des Bedienungspersonals zu verhindern. Das nachträgliche Einbringen der Substanz vermindert die Aerosolbildung wesentlich und vermindert somit das Arbeitsrisiko bedeutend. Die Herstellung erfolgt entsprechend Beispiel 1.

Auch diese Formulierung kann lokal zur Behandlung von Lungen-CAs eingesetzt werden.

##### Beispiel 3

Der Fluoreszenzmarker Calcein wird häufig in der Grundlagenforschung eingesetzt. Er ist nicht autoklavierbar, so dass sterile Calcein-Liposomen-gel nur durch nachträglichen Calcein-Zusatz, hergestellt werden können. Die Herstellung erfolgt entsprechend Beispiel 1 nach Sterilfiltration der Calcein-Lösung. Mittels dieser Zubereitung lassen sich Freisetzungs- und Verteilungsversuche, z. B. in der Mikrobiologie durchführen.

##### Beispiel 4

Das Verfahren eignet sich grundsätzlich auch zur Verkapselung von lipophilen Substanzen, die nicht in das wässrige Kompartiment, sondern in den Liposomenlayer eingeschlossen werden. Hierzu wird das Antibiotikum Amphotericin B als Festsubstanz dem Liposomen-gel zugesetzt und anschließend bei 50 W für 3 Stunden unter Schütteln inkubiert. Die Einschlusseffizienz beträgt 95%.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Liposomen, die als Wirkstoff mindestens eine physiologisch wirksame oder/und diagnostische Verbindung enthalten, durch Herstellen eines Gemisches von membranbildenden Amphiphilen, Dispergieren des Gemisches in Wasser und Hochdruckhomogenisation der Dispersion bis zur Bildung der Liposomen, **dadurch gekennzeichnet**, dass

(a) zu einer Liposomenzubereitung der Wirkstoff gegeben wird und

(b) das den Wirkstoff enthaltende Gemisch solange inkubiert wird, bis

(i) hydrophile Wirkstoffe entsprechend der Volumenanteile an wässrigem Medium innerhalb und außerhalb der Liposomen in der Zubereitung in den Liposomen bzw. zwischen den Liposomen verteilt sind (Gleichgewichtszustand) oder

(ii) lipophile Verbindungen im Lipidbilayer inkorporiert sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Lipid enthaltende Liposomenzubereitung

ein aus Liposomen aufgebautes Gel verwendet wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Liposomengel mit mindestens 20 Gew.-% Lipidgehalt verwendet wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Inkubation unter mechanischer Bewegung erfolgt. 5

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als therapeutischer Wirkstoff Gemcitabine, Vindesine, Amphotericin B, cis-Platin oder/und Anthrazykline, insbesondere Doxorubicin, verwendet wird. 10

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Fluoreszenzfarbstoff Calcein verwendet wird. 15

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das den Wirkstoff enthaltende Gemisch bei einer Temperatur von 30 bis 80°C, vorzugsweise von 50 bis 70°C, am meisten bevorzugt bei 60°C inkubiert wird. 20

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch inkubiert wird, bis ein Gleichgewicht vorliegt zwischen freier Verbindung und in die Liposomen aufgenommener Verbindung. 25

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch inkubiert wird, bis 20 bis 80%, bei lipophilen Verbindungen vorzugsweise > 95% des in dem Gel oder der Suspension enthaltenen Wirkstoffs in den Liposomen vorliegt. 30

10. Liposomenzubereitung, erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9.

11. Verwendung einer Liposomenzubereitung, erhältlich nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 als diagnostisches oder therapeutisches Mittel, das gegebenenfalls weitere Hilfs-, Trägerstoffe oder/und Stabilisatoren enthält. 35

40

45

50

55

60

65